



PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAÎTE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5 : C12N 15/86, A61K 48/00, C12N 15/12, 15/11		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/24297 (43) Date de publication internationale: 27 octobre 1994 (27.10.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00421			(81) Etats désignés: AU, CA, FI, HU, JP, NO, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Date de dépôt international: 15 avril 1994 (15.04.94)			
(30) Données relatives à la priorité: 93/04745 22 avril 1993 (22.04.93)	FR		Publiée Avec rapport de recherche internationale.
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).			
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): PERRICAUDET, Michel [FR/FR]; 20, résidence du Moulin, F-28150 Quarville (FR). HADDADA, Hedi [FR/FR]; Appartement 221, 1, rue Jules-Guesdes, F-94140 Alfortville (FR). MAY, Evelyne [FR/FR]; 67, rue du Chemin-Vert, F-75011 Paris (FR).			
(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).			
(54) Title: DEFECTIVE RECOMBINANT ADENOVIRUSES FOR GENE THERAPY OF TUMOURS			
(54) Titre: ADENOVIRUS RECOMBINANTS DEFECTIFS POUR LA THERAPIE GENIQUE DES TUMEURS			
(57) Abstract			
Recombinant adenoviruses comprising a heterologous DNA sequence, preparation thereof, and use thereof for the treatment and/or prevention of cancer.			
(57) Abrégé			
La présente invention concerne des adénovirus recombinants comportant une séquence d'ADN hétérologue, leur préparation, et leur utilisation pour le traitement et/ou la prévention des cancers.			
<p>mp53 pIX.CMV 7854 bps</p> <p>Restriction sites shown: 6619,SphI, 6412,XmnI, 6295,SalI, 7212,SphI, 7200,EcoRI, 7039,NarI, 7821,XbaII, 7821,BglI, 4565,HindIII, 4417,SalI, 4113,XbaII, SphI,3455, Ball,3694, McI,3694, StuI,3803, NarI,3842, HpaI,1508, EcoRI,1633, StuI,1150, SphI,1985.</p> <p>Genetic elements: PromocMV, p53m, SVL.PolyAd.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LJ	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettouie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finnlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

ADENOVIRUS RECOMBINANTS DEFECTIFS POUR LA THERAPIE GENIQUE DES TUMEURS

La présente invention concerne des vecteurs recombinants d'origine virale et leur utilisation pour le traitement des cancers. Plus particulièrement, elle concerne des adénovirus recombinants comportant une séquence d'ADN hétérologue dont l'expression dans une cellule se divisant anormalement permet d'inhiber au moins partiellement la division de ladite cellule. L'invention concerne également la préparation de ces vecteurs et les compositions pharmaceutiques les contenant.

La croissance cellulaire est régulée de manière extrêmement subtile par deux types de signaux. Certains favorisent la multiplication des cellules, tandis que d'autres, au contraire, les font entrer dans un état quiescent ou les font se différencier, selon les besoins de l'organisme. Les cancers sont tous caractérisés par un dérèglement des mécanismes contrôlant la division cellulaire, conduisant à une prolifération anormale. Le plus souvent, le développement d'un cancer implique donc l'activation de gènes favorisant la multiplication des cellules (gènes désignés proto-oncogènes, qui sont activés en oncogènes) et la disparition ou l'inactivation de gènes inhibant la prolifération cellulaire. La présente invention offre la possibilité de traiter les cancers par la thérapie génique, par l'administration, à des cellules tumorales, d'un ou plusieurs de ces gènes dont l'expression permet d'inhiber au moins partiellement la prolifération cellulaire.

La thérapie génique consiste à corriger une déficience ou une anormalité (mutation, expression aberrante, etc) par introduction d'une information génétique dans la cellule ou l'organe affecté. Cette information génétique peut être introduite soit *in vitro* dans une cellule extraite de l'organe, la cellule modifiée étant alors réintroduite dans l'organisme, soit directement *in vivo* dans le tissu approprié. Dans ce second cas, différentes techniques existent, parmi lesquelles des techniques diverses de transfection impliquant des complexes d'ADN et de DEAE-dextran (Pagano et al., J.Viro. 1 (1967) 891), d'ADN et de protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989) 375), d'ADN et de lipides (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413), l'emploi de liposomes (Fraley et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), etc. Plus récemment, l'emploi de virus comme vecteurs pour le transfert de gènes est apparu comme une alternative prometteuse à ces techniques physiques de transfection. A cet égard, différents virus ont été testés pour leur capacité à infecter certaines populations

- 2 -

cellulaires. En particulier, les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc), le virus HSV, les virus adéno-associés, et les adénovirus.

La possibilité d'utiliser la thérapie génique pour traiter les cancers a déjà été évoquée dans la demande WO91/15580. Cette demande décrit la construction de 5 rétrovirus contenant un gène codant pour un ribozyme, dont l'expression en culture cellulaire peut permettre de détruire un ARNm d'un oncogène.

La présente invention résulte de la mise en évidence que les adénovirus constituent des vecteurs particulièrement efficaces pour le transfert et l'expression de 10 gènes thérapeutiques dans les tumeurs. En particulier, les adénovirus présentent l'avantage de ne pas s'intégrer au génome des cellules qu'ils infectent, de s'y maintenir de manière très stable ce qui permet d'obtenir un effet thérapeutique durable, et d'avoir un spectre d'hôte très large, ce qui permet une application au traitement de cancers 15 affectant tout type de cellules. Par ailleurs, l'invention repose également sur la mise en évidence que les virus de type adénovirus sont capables de transférer et d'exprimer des gènes capables d'inhiber au moins partiellement la division cellulaire directement au niveau de tumeurs.

Un premier objet de l'invention réside donc dans un adénovirus recombinant défectif contenant une séquence d'ADN hétérologue dont l'expression permet d'inhiber au moins partiellement la division cellulaire.

20 L'invention a également pour objet l'utilisation d'un tel adénovirus recombinant défectif pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention des cancers.

Au sens de la présente invention, le terme "adénovirus défectif" désigne un 25 adénovirus incapable de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des adénovirus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réPLICATION dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et 30 notamment par le gène inséré. Préférentiellement, le virus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales.

- 3 -

Il existe différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu. Néanmoins, ces virus ne sont pas pathogènes pour l'homme, et notamment les sujets non immuno-déprimés. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5).

5 Dans le cas des adénovirus Ad 5, les séquences nécessaires à la réPLICATION sont les régions E1A et E1B.

Au sens de la présente invention, la séquence d'ADN hétérologue dont l'expression permet d'inhiber au moins partiellement la division cellulaire comprend de la préférence au moins un gène choisi parmi les gènes suppresseur de tumeur (ou anti-oncogène) ou tout dérivé actif desdits gènes; les gènes antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet d'inhiber l'expression de gènes favorisant la division cellulaire; ou les gènes dont le produit d'expression induit une apoptose de la cellule infectée.

Parmi les gènes suppresseurs de tumeur utilisables dans le cadre de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les gènes suivants :

15 - Gène p53 :

Le gène p53 code pour une protéine nucléaire de 53 kDa. La forme mutée par délétion et/ou mutation de ce gène est impliquée dans le développement de la plupart des cancers humains (Baker et coll., Science 244 (1989) 217). Ses formes mutées sont également capables de coopérer avec les oncogènes ras pour transformer 20 des fibroblastes murins. Le gène sauvage codant pour la p53 native inhibe en revanche la formation des foyers de transformation dans des fibroblastes de rongeurs transfectés avec diverses combinaisons d'oncogènes. Des données récentes soulignent que la protéine p53 pourrait être elle-même un facteur de transcription et stimuler l'expression d'autres gènes suppresseurs de tumeur.

25 - Gène Rb

Le gène Rb détermine la synthèse d'une phosphoprotéine nucléaire de 927 acides aminés environ (Friend et coll., Nature 323 (1986) 643) dont la fonction est de réprimer la division des cellules en les faisant entrer en phase de quiescence. Des formes inactivées du gène Rb ont été mises en cause dans différentes tumeurs, et 30 notamment dans les rétinoblastomes ou dans les cancers mésenchymateux comme les ostéosarcomes. La réintroduction de ce gène dans les cellules tumorales où il était inactivé produit un retour à l'état normal et une perte de la tumorigénérité (Huang et coll., Science 242 (1988) 1563). Récemment, il a été démontré que la protéine Rb

normale, mais pas ses formes mutées, réprime l'expression du proto-oncogène c-fos, gène indispensable à la prolifération cellulaire.

- Gène rap 1A

Le gène rap 1A (également désigné k-rev1) code pour une protéine de 21
5 kDa associée à la face interne de la membrane cytoplasmique. Cette protéine est capable, à des niveaux élevés, de réverter des cellules transformées exprimant les oncogènes ras mutés (Kitayama et coll., Cell 56 (1989) 77).

- Gène DCC

Le gène DCC code pour une protéine homologue avec les protéines d'adhésion cellulaire de la famille N-CAM. Ce gène est très fréquemment déleté dans
10 les carcinomes du colon (Fearon et coll., Science 247 (1990) 49).

- Gènes k-rev2 et k-rev3

Le gène k-rev2 code pour une protéine sécrétée de 60 acides aminés, et le gène k-rev3 code pour une version tronquée d'une protéine de la matrice extracellulaire. Ces deux gènes sont capables de réverter des cellules NIH 3T3
15 transformées par l'oncogène Ki-ras.

D'autres gènes peuvent être utilisés dans le cadre de la présente invention pour leur effet anti-tumoral, et notamment d'autres gènes suppresseurs de tumeur décrits dans la littérature, ou tout autre gène dont le produit d'expression peut induire
20 l'apoptose cellulaire.

Comme indiqué plus haut, la séquence d'ADN hétérologue peut comporter le gène suppresseur de tumeur natif ou un dérivé actif dudit gène. Un tel dérivé peut être obtenu par mutation, délétion, substitution et/ou addition d'une ou plusieurs paires de bases dans la séquence du gène, selon les techniques classiques de biologie moléculaire. L'activité du dérivé ainsi obtenu peut ensuite être confirmée *in vitro* sur des tests connus de l'homme du métier, tels que ceux décrits dans les exemples.
25

Au sens de l'invention, la séquence d'ADN hétérologue peut également comprendre un gène antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires codant pour des protéines favorisant la prolifération cellulaire. De tels gènes peuvent par exemple être
30

transcrits, dans la cellule cible, en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine.

Parmi les gènes antisens utilisables dans le cadre de l'invention, on peut citer plus particulièrement toute séquence antisens permettant de diminuer les niveaux de production des oncogènes ras, myc, fos, c-erb B, etc.

Généralement, la séquence d'ADN hétérologue comprend également des séquences promotrices permettant l'expression du ou des gènes capables d'inhiber au moins partiellement la division cellulaire dans la cellule cible. Il peut s'agir de séquences promotrices qui sont naturellement responsables de l'expression dudit gène 10 lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de séquences promotrices d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De 15 même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris l'adénovirus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, RSV, etc. En outre, ces séquences promotrices peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, etc. Par ailleurs, lorsque la séquence d'ADN hétérologue ne comporte pas de séquences d'expression, 20 elle peut être insérée dans le génome du virus défectif en aval d'une telle séquence. Il est également possible d'utiliser des promoteurs inductibles.

Par ailleurs, dans un autre mode de mise en oeuvre de l'invention, la séquence d'ADN hétérologue comprend, en plus du gène suppresseur de tumeur ou du gène antisens, un gène codant pour un antigène spécifique de tumeur et/ou un gène codant pour une lymphokine. La combinaison de ces gènes permet en effet (i) de stopper la division cellulaire dans une tumeur et ainsi, de faire régresser ladite tumeur, et (ii), 25 d'augmenter la réponse immunitaire de l'organisme contre ladite tumeur.

Les antigènes spécifiques de tumeur sont des motifs antigéniques qui apparaissent à la surface de cellules tumorales, mais qui n'existent pas à la surface des 30 mêmes cellules non tumorales. De tels antigènes sont généralement utilisés pour le diagnostic de cancers. Plus récemment, ils ont été décrits pour la réalisation de vaccins anti-tumoraux (EP 259 212). Cependant, ils n'ont jamais été combinés à d'autres gènes thérapeutiques comme dans le cadre de la présente invention.

- 6 -

Parmi les gènes codant pour des lymphokines, on peut citer plus particulièrement les gènes codant pour les interleukines (IL-1 à IL-13), les interférons, les facteurs de nécrose des tumeurs, les facteurs de stimulation des colonies (G-CSF, M-CSF, GM-CSF, etc), le TGF β , etc. Par ailleurs, le gène codant pour la lymphokine comprend généralement, en amont de la séquence codante, une séquence d'expression et une séquence signal dirigeant le polypeptide synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle de la lymphokine, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle. De telles constructions permettent en particulier d'augmenter les taux de lymphokine de manière très localisée, et ainsi, en présence d'un antigène spécifique de tumeur, d'amplifier la réponse immunitaire contre un type particulier de tumeur, ce qui donne un effet particulièrement avantageux. De tels adénovirus recombinants sont particulièrement utilisables pour la préparation de vaccins anti-tumoraux.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la séquence d'ADN hétérologue. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de complémer la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %).

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits précédemment. De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation directement injectable dans les tumeurs à traiter. Il peut s'agir en particulier de

- 7 -

solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. L'injection directe dans la tumeur à traiter est avantageuse car elle permet de concentrer l'effet thérapeutique au niveau des tissus
5 affectés.

Les doses d'adénovirus recombinant défectif utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus
10 recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement
15 après 48 heures, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

La présente invention offre ainsi un moyen très efficace pour le traitement ou la prévention des cancers. En outre, ce traitement peut concerner aussi bien l'homme que tout animal tel que les ovins, les bovins, les animaux domestiques (chiens, chats, etc), les chevaux, les poissons, etc.
20

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures

Figure 1 : Représentation du vecteur mp53wtI-.CMV

25 Figure 2 : Représentation du vecteur mp53pIX.CMV

Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césum, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la
30 purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de

l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée *in vitro* par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Exemples

30 **E1. Construction du vecteur mp53wtI-CMV portant le gène p53 sous le contrôle du promoteur du cytomégalovirus (figure 1).**

Le vecteur d'expression eucaryote mp53wtI-CMV a été construit à partir du plasmide pUC19, par insertion :

- d'une région promotrice d'origine virale qui correspond au promoteur précoce du cytomégalovirus (CMV). Cette région est entourée dans le vecteur de sites de restrictions uniques EcoRI-SphI à la jonction CMV / pUC et BamHI à la jonction CMV / p53. La présence de sites uniques flanquant la région promotrice permet de remplacer la région CMV par tout autre promoteur. Une deuxième série de vecteurs est ainsi obtenue dans laquelle le gène p53 est placé sous le contrôle d'un promoteur inductible : le promoteur de la metallothioneine, inductible par les métaux lourds (cadmium et zinc).

- d'une séquence de 1173 pb correspondant à l'ADNc codant pour la protéine p53 de souris sous sa forme sauvage (Zakut-Houri et al., Nature 36 (1983) 594). Dans cette construction, le gène suppresseur est sous forme d'ADNc, c'est-à-dire dépourvue d'introns. Ceci permet notamment de réduire la taille du vecteur. Par ailleurs, il a été vérifié que les niveaux d'expression obtenus sont comparables en présence ou en l'absence d'introns.

- du signal de polyadénylation des gènes tardifs du virus SV40, qui correspond à un signal de polyadénylation très efficace. Deux sites de restriction uniques Sall et HindIII sont situés en aval du signal de polyadénylation. Ces sites ont permis l'insertion des régions pIX de l'adénovirus (Cf E3).

E2. Activité *in vitro* du vecteur mp53wtI-CMV

La fonctionnalité du vecteur mp53wtI-CMV a été confirmée *in vitro*, par expression transitoire dans les cellules HeLa. Pour cela, le vecteur a été introduit dans les cellules par transfection et, 40 heures après, la protéine p53 a été dosée par immunofluorescence et immunoprecipitation. Les résultats obtenus montrent que plus de 50% des cellules transfectées induisent des taux importants de protéine p53.

E3. Construction du vecteur mp53pIX.CMV

Les plasmides utilisés pour générer, par recombinaison homologue, les adénovirus recombinants exprimant le gène p53 ont été construits comme suit :

Le vecteur d'expression eucaryote mp53pIX.CMV a été construit par insertion de la séquence pIX issue du génome de l'adénovirus entre les sites Sall et EcoRI de mp13wtI-CMV. La séquence pIX a été isolée à partir du plasmide recombinant pLTR-βgal pIX (Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest. 90 (1992) 626) par digestion au moyen des enzymes EcoRV et HindIII.

- 10 -

Le vecteur d'expression mp53pIX.CMV ainsi obtenu (figure 2) possède un site unique HindIII en aval de l'insert pIX ce qui permet une linéarisation de la construction (Cf E4.).

5 **E4. Construction d'un adénovirus recombinant défectif portant le gène p53 sous le contrôle du promoteur CMV.**

Le vecteur mp53pIX.CMV est linéarisé et cotransfecté avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en *trans* les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E11B) d'adénovirus.

On obtient l'adénovirus Ad.p53 par recombinaison homologue *in vivo* entre 10 l'adénovirus mutant Ad-d1324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543) et le vecteur mp53pIX.CMV, selon le protocole suivant : après linéarisation par l'enzyme HindIII, le plasmide mp53pIX.CMV et l'adénovirus d1324 sont co-transfектés dans la lignée 15 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés sont sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant est amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10¹⁰ pfu/ml.

20 Les particules virales sont ensuite purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césum selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). L'adénovirus Adp53 peut être conservé à -80°C dans 20 % de glycérol.

25 La capacité de l'adénovirus Ad-p53 à infecter des cellules en culture et à exprimer dans le milieu de culture une forme biologiquement active de la p53 sauvage a été démontrée par infection des cellules de la lignée 293 humaine. La présence de p53 dans le surnageant de culture a ensuite été mise en évidence au moyen d'un anticorps monoclonal spécifique de la p53.

Ces études permettent de montrer que l'adénovirus exprime bien une forme biologiquement active de la p53.

REVENDICATIONS

1. Adénovirus recombinant défectif contenant une séquence d'ADN hétérologue dont l'expression dans une cellule cible permet d'inhiber au moins partiellement la division cellulaire.
- 5 2. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il est dépourvu des régions de son génome qui sont nécessaires à sa réPLICATION dans la cellule cible.
3. Adénovirus selon la revendication 2 caractérisée en ce qu'il sagit d'un adénovirus de type Ad 5.
- 10 4. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la séquence d'ADN hétérologue contient au moins un gène suppresseur de tumeur ou un dérivé actif d'un tel gène.
5. Adénovirus selon la revendication 4 caractérisé en ce que le gène suppresseur de tumeur est choisi parmi les gènes p53, Rb, rap 1A, DCC k-rev2 et k-rev3, ou un dérivé actif de ceux-ci.
- 15 6. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la séquence d'ADN hétérologue contient au moins un gène antisens dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler la transcription ou la traduction de gènes favorisant la prolifération cellulaire.
- 20 7. Adénovirus selon la revendication 6 caractérisée en ce que le gène antisens permet de diminuer les niveaux de traduction des oncogènes ras, myc, fos et/ou c-erb.
8. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la séquence d'ADN hétérologue contient au moins un gène dont le produit d'expression induit l'apoptose de la cellule infectée.
- 25 9. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisée en ce que la séquence d'ADN hétérologue comprend des séquences promotrices permettant l'expression, dans la cellule infectée, du gène inhibant au moins partiellement la division cellulaire.

- 12 -

10. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisée en ce que la séquence d'ADN hétérologue comprend en outre un gène codant pour un antigène spécifique de tumeur et/ou un gène codant pour une lymphokine.
11. Utilisation d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 10 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des cancers.
12. Utilisation selon la revendication 11 pour la préparation d'une composition pharmaceutique en vue d'une administration directe dans la tumeur à traiter.
- 10 13. Utilisation selon la revendication 11 pour la préparation d'un vaccin antitumoral.
14. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 10.
- 15 15. Composition pharmaceutique selon la revendication 13 caractérisée en ce qu'elle est sous forme injectable.
16. Composition pharmaceutique selon la revendication 13 caractérisée en ce qu'elle comprend entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml adénovirus recombinants défectifs.

1/2

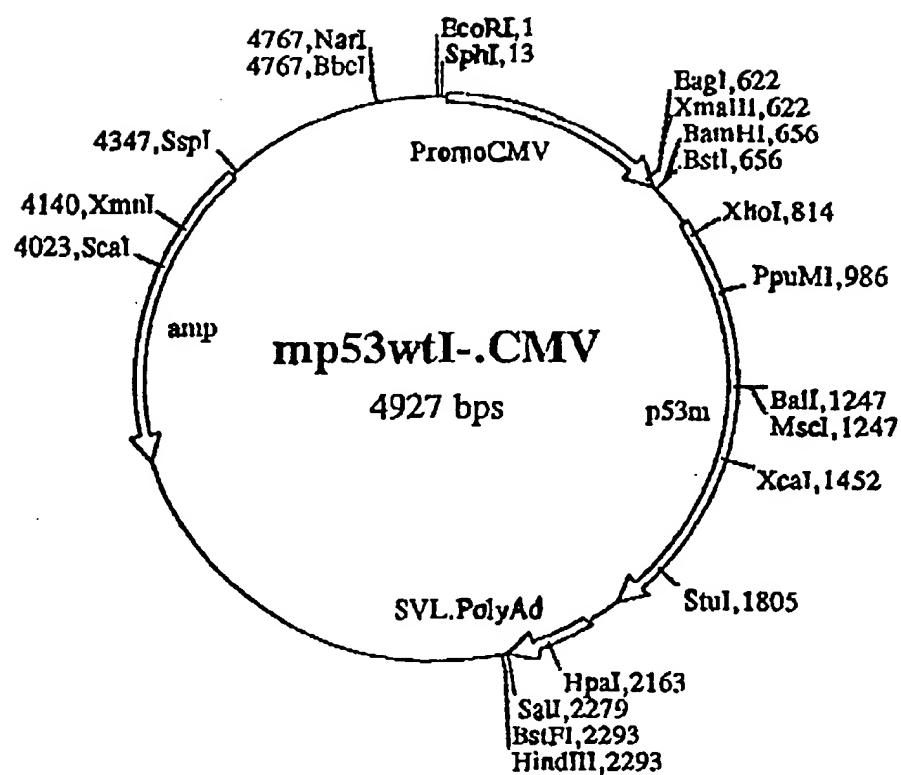


FIGURE 1

2/2

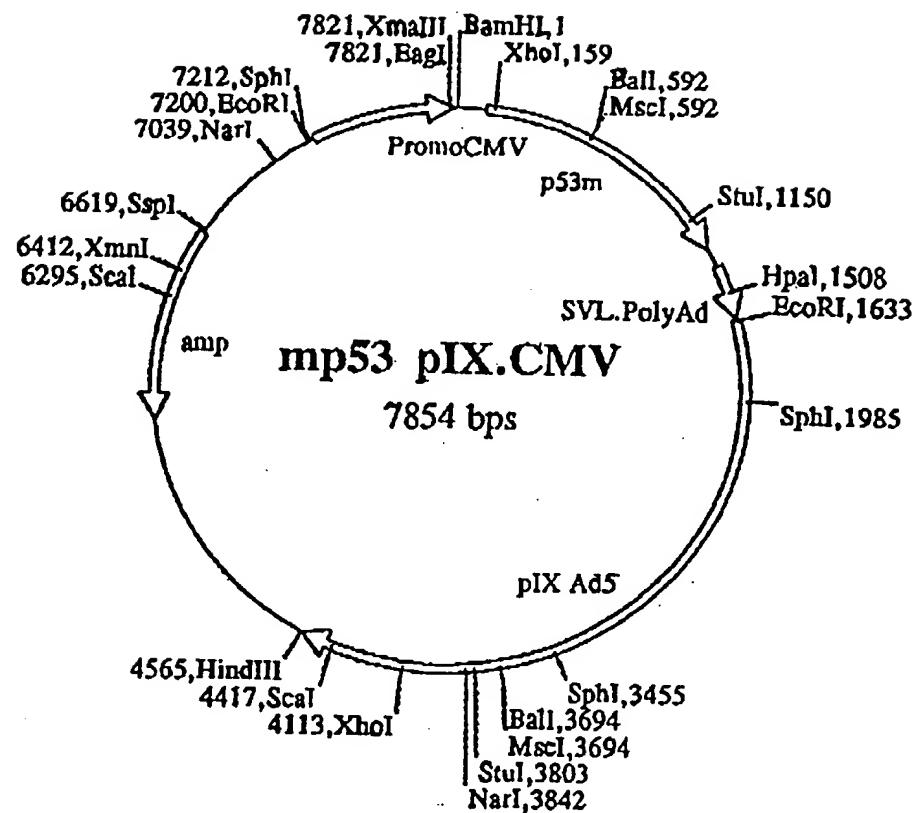


FIGURE 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No PCT/FR 94/00421

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 5 C12N15/86 A61K48/00 C12N15/12 C12N15/11

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 5 C12N A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
--

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY vol. SUPPL, no. 17E , 29 March 1993 page 204 WILLS, K.N. & MENZEL, P. 'Adenovirus vectors for gene therapy of cancer' voir résumé S 216 & Keystone Symposium on genetically targeted research and therapeutics. Antisense and gene therapy, Keystone, USA ;12 au 18 Avril 1993 ---	1, 4, 5, 9, 11
X, O	-/-	1

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 July 1994

Date of mailing of the international search report

- 4. 08. 94

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 cpo nl
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte. n Application No
PCT/FR 94/00421

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY vol. SUP, no. 18A , 4 January 1994 page 237 GREGORY, R.J. ET AL. 'Tumor suppressor gene therapy of cancer: adenoviral mediated gene transfer of the p53 cDNA into human tumor' voir résumé DZ 307 ---	1-6,9, 11,13-15
P,X	WO,A,93 19191 (CNRS, INSTITUT GUSTAVE ROUSSY) 30 September 1993 see the whole document ---	1-3,9-15
X	WO,A,93 03769 (USA DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 4 March 1993 see page 10, line 1 - line 5; claims 1-5,12,13; figure 1 ---	1-5,8,9, 11-15
E	WO,A,94 10323 (IMPERIAL CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LTD) 11 May 1994 see page 14, line 20 - page 19, line 28; example 3 ---	1-9, 11-15
A	AMERICAN REVIEW OF RESPIRATORY DISEASES vol. 145, no. 4 P2 , April 1992 page A425 BRODY,S.L. ET AL. 'In vivo gene transfer to malignant mesothelioma using an adenovirus vector' & 1992 International Conference of the American Lung Association and the American Thoracic Society Miami Beach, USA; 17-20 Mai 1992 -----	1
O,A		1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 94/00421

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9319191	30-09-93	FR-A-	2688514	17-09-93
		AU-B-	3757093	21-10-93
		CA-A-	2102302	17-09-93
		EP-A-	0593755	27-04-94
WO-A-9303769	04-03-93	AU-A-	2500692	16-03-93
		CA-A-	2115742	04-03-93
WO-A-9410323	11-05-94	NONE		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den : Internationale No
PCT/FR 94/00421

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 5 C12N15/86 A61K48/00 C12N15/12 C12N15/11

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 5 C12N A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY vol. SUPPL, no. 17E , 29 Mars 1993 page 204 WILLS, K.N. & MENZEL, P. 'Adenovirus vectors for gene therapy of cancer' voir résumé S 216	1,4,5,9, 11
X,O	& Keystone Symposium on genetically targeted research and therapeutics. Antisense and gene therapy, Keystone, USA ;12 au 18 Avril 1993 ----	1

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qui indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 Juillet 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

- 4. 08. 94

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentdaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 94/00421

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		no. des revendications visées
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	
P,X	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY vol. SUP, no. 18A , 4 Janvier 1994 page 237 GREGORY, R.J. ET AL. 'Tumor suppressor gene therapy of cancer: adenoviral mediated gene transfer of the p53 cDNA into human tumor' voir résumé DZ 307 ---	1-6,9, 11,13-15
P,X	WO,A,93 19191 (CNRS, INSTITUT GUSTAVE ROUSSY) 30 Septembre 1993 voir le document en entier ---	1-3,9-15
X	WO,A,93 03769 (USA DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 4 Mars 1993 voir page 10, ligne 1 - ligne 5; revendications 1-5,12,13; figure 1 ---	1-5,8,9, 11-15
E	WO,A,94 10323 (IMPERIAL CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LTD) 11 Mai 1994 voir page 14, ligne 20 - page 19, ligne 28; exemple 3 ---	1-9, 11-15
A	AMERICAN REVIEW OF RESPIRATORY DISEASES vol. 145, no. 4 P2 , Avril 1992 page A425 BRODY,S.L. ET AL. 'In vivo gene transfer to malignant mesothelioma using an adenovirus vector'	1
O,A	& 1992 International Conference of the American Lung Association and the American Thoracic Society Miami Beach, USA; 17-20 Mai 1992 -----	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Doc	: Internationale No
PCT/FR	94/00421

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9319191	30-09-93	FR-A- 2688514 AU-B- 3757093 CA-A- 2102302 EP-A- 0593755	17-09-93 21-10-93 17-09-93 27-04-94
WO-A-9303769	04-03-93	AU-A- 2500692 CA-A- 2115742	16-03-93 04-03-93
WO-A-9410323	11-05-94	AUCUN	